

ردیابی همولوگ ژن توماتیناز در ژنوم قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

فاطمه زرنندی^{۱*} - فرهاد شکوهی^۲ - بهرام شریف نبی^۳ - بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی^۴ - ضیاء الدین بنی هاشمی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۲

چکیده

قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی جهت غلبه بر سیستم دفاعی گیاه از ابزار مختلفی بهره می‌گیرند. ترکیبات فیتوآنتیسیپین از جمله مواد دفاعی است که در گیاه جهت جلوگیری از حمله بیمارگرها تولید می‌شود. آنزیم توماتیناز جهت تجزیه فیتوآنتیسیپین و غلبه بر سیستم دفاعی گیاه توسط طیفی از قارچ‌ها از جمله تعدادی از فرم‌های اختصاصی قارچ *F. oxysporum* تولید می‌شود. با هدف ردیابی توالی کد کننده آنزیم توماتیناز در فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی محافظت شده بالادست و پائین دست توالی کدکننده ژن FoTom1 گزارش شده از فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (Fol) طراحی شد. استخراج DNA از نژاد یک، شایع در استان خراسان، انجام شد و واکنش تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. الگوی الکتروفورزی محصول واکنش حضور یک تک باند در اندازه مورد انتظار را تأیید نمود. قطعه تکثیر شده بصورت دو جهته توالی‌یابی شد و با توالی گزارش شده از فرم اختصاصی Fol مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج توالی‌یابی با استفاده از برنامه Vector NTi V11 بر هم منطبق شد و با توالی رفرنس همدردی انجام شد. نتایج نشان داد در سطح نوکلئوتیدی ۱۴ جهش در توالی شناسائی شده وجود دارد که از این بین ۷ جهش در سطح توالی پروتئینی نیز بروز می‌یابند. آنالیز توالی با استفاده از برنامه Pfam وجود یک توالی سیگنال پپتید و یک دومین هیدرولازی را در توالی شناسائی شده تأیید نمود. این نتایج نشان داد که توالی ردیابی شده می‌تواند همولوگ ژن توماتیناز در ژنوم فرم اختصاصی Fom باشد. این توالی Fom-Tom نامگذاری شد و در بانک ژن با شماره بازایی MF178403 ثبت شد. با هدف پیش‌بینی اثر جهش‌ها شناسائی شده در عملکرد ژن توماتیناز آنالیزهای نرم‌افزاری انجام شد که نشان داد جهش‌های رخ داده در توالی دومین هیدرولازی ساختمان پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند و می‌توانند در عملکرد ژن تأثیر گذار باشند.

واژه‌های کلیدی: بیماری زردی و پژمردگی آوندی خربزه، خربزه، ردیابی ژن، ژن توماتیناز

مقدمه

هیدروکسیلی استرول‌های غشایی قارچ کمپلکس تشکیل داده و باعث ایجاد منفذ و نشت سلولی و در نتیجه از بین رفتن غشای قارچی می‌گردد (۱۰، ۱۸، ۲۰، ۲۸، ۳۰ و ۱۷). بیمارگرها نیز استراتژی‌های مخصوصی برای عبور از این ترکیبات ضد قارچ در اختیار دارند (۳، ۴ و ۱۴). یکی از روش‌های مورد استفاده در قارچ‌ها استفاده از آنزیم‌های تخریب کننده ترکیبات درگیر در سیستم دفاع گیاهی است (۸، ۱۴ و ۱۵). آنزیم توماتیناز از جمله آنزیم‌های ترشحی است که توسط قارچ ترشح شده و با تخریب توماتین شرايط را جهت توسعه ریشه‌های قارچ در بافت گیاه مهیا می‌کند (۱۴، ۱۶، ۱۱، ۱۳، ۱۶ و ۱۹). آنزیم توماتیناز یک آنزیم گلیکوزیل هیدرولازی است. این خانواده از آنزیم‌های گلیکوزیل هیدرولاز، دارای ساختار آنومریک نگاهداری و توپولوژی شکافی می‌باشد (۵). آنزیم‌های گلیکوزیل هیدرولاز با برداشت گروه های قندی از ساپونین‌ها باعث آزادسازی گروه‌های قندی و کاهش سمیت این ترکیبات می‌شوند (۸، ۱۴، ۱۵، ۱۱، ۱۳ و ۶). در سال ۱۹۹۷ میلادی، توماتیناز موجود در فرم اختصاصی *F. oxysporum* f.

گیاهان مکانیسم‌های دفاعی مختلفی برای محافظت خود در برابر تعداد زیادی از بیمارگرهای مهاجم دارند (۱). فیتوآنتی‌سیپین‌ها، ترکیبات دفاعی هستند که به طور ساختاری در گیاهان سالم وجود دارند و نوعی مانع شیمیایی داخلی نسبت به عوامل بیماری‌زا بشمار می‌روند (۱۴ و ۲۱). توماتین، آلکالوئید گلیکوزیدی متشکل از یک آگلیکون (توماتیدین) و یک تتراساکارید (بتا لیکوتتراوز) است (۲) که به واسطه گروه بتا ۳ هیدروکسیل خود با گروه‌های آزاد بتا

۱ و ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

(*- نویسنده مسئول: Email: fateme.zarandi77@yahoo.com)

۲- استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳- استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

۵- استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز

بازیابی توالی ژن FoTom1 و طراحی آغازگر: توالی ژن FoTom1 (با شماره دستیابی AJ012668) و پروتئین توماتیناز مربوط به فرم اختصاصی FOL (با شماره دستیابی CAA10112.1) از پایگاه داده‌های زیستی بازیابی شد. مناطق بالادستی و پائین‌دستی توالی کدکننده، از طریق بلاست توالی پروتئین FoTom1 از بانک اطلاعات ژنومی قارچ فوزاریوم (<http://www.broadinstitute.org>) بدست آمد. مناطق حفاظت شده جهت طراحی آغازگر با استفاده از هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه با استفاده از برنامه MegAlign در بسته نرم‌افزاری DNA Star انجام شد. جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی از برنامه Primer premier V.5 استفاده گردید. این آغازگرها با نام‌های Psh30-F (5'-AGC CGC ATA) و Psh30-R (3'-TTG GCA ACC TGA) و (3'-ACA GCA-5') توسط شرکت SBS Genetech Co., Beijing's, China سنتز شدند.

ردیابی و تکثیر توالی ژن در ژنوم Fom: جهت تکثیر توالی هدف دمای اتصال آغازگرها در سه نقطه ۵۴، ۵۵ و ۵۶ درجه و غلظت DNA الگو در دو سطح ۶۰ و ۱۲۰ نانوگرم مورد مقایسه قرار گرفت و بهینه‌سازی شد. محتویات واکنش تکثیر در حجم ۱۰ میکرولیتری شامل ۶۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۲٫۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (GeNetBio, south Korea) و یک میکرولیتر بافر PCR 10X (GeNetBio, south Korea)، پنج پیکومول از آغازگرهای pSH30-F و pSH30-R با یک واحد آنزیم تک پلیمراز (Prime™ Taq DNA polymerase, GeNetBio, south Korea) اضافه شد و با برنامه حرارتی ۴ دقیقه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و مرحله تکثیر نهایی با پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Primus 25 Thermal Cycler, MWG Biotech Inc.) استفاده شد. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی ۱۰٪ رنگ Green viewer الکتروفورز گردید و تصویر الگوی بانندی تکثیر شده از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ژل داک تهیه شد.

توالی‌یابی قطعه تکثیر شده و آنالیز توالی و شناسایی جهش‌ها: قطعات تکثیری به صورت دوجهته توسط آغازگرهای اختصاصی Psh30R و Psh30F توسط شرکت Macro gene کره جنوبی توالی‌یابی شدند. برای آنالیز و بررسی پیک‌ها از نرم‌افزارهای Chromas و Seqman، هم‌ردیفی با توالی مرجع از Mega5 و نمایش نتایج هم‌ردیفی و جهش‌های موجود از CLC Main Workbench 5.5 استفاده گردید.

پیش‌بینی تأثیر جهش در ساختار پروتئین: با استفاده از برنامه SMART و نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5، ساختار

sp. *radicis-lycopersici* در سطح پروتئین بررسی و ردیابی شد (۱۱). فعالیت توماتینازی در قارچ‌هایی که بیمارگر گوجه فرنگی نیستند از قبیل *gladioli* و *niveum melonis tuberosae* به ترتیب فرم اختصاصی بیماریزا روی گیاهان گل مریم، خربزه، هندوانه و گلایل مشاهده شده است (۹ و ۱۲). بر خلاف این در فرم‌های *ciceri*، *conglutinans* و *lini* به ترتیب عوامل بیماریزا روی گیاهان نخود، ذرت و کتان فعالیت توماتینازی مشاهده نشد (۱۲). در برخی از فرم‌های اختصاصی از جمله *melonis* حضور ژن توماتیناز با استفاده از روش هیبریداسیون مورد بررسی قرار گرفته است و حضور بخشی از توالی آن در یکی از جدایه‌های این فرم اختصاصی یک هیبریداسیون نشان داده شده (۸) ولی تاکنون توالی کامل آن مشخص ردیابی و شناسایی نشده است. لذا با توجه به شباهت عملکرد انتظار می‌رود بر اساس توالی‌های گزارش شده این ژن در دیگر فرم‌های اختصاصی بتوان توالی آن را در فرم اختصاصی *F. oxysporum f.sp. melonis* ردیابی و تکثیر نمود.

شناسایی و همسانه‌سازی ژن توماتیناز در این فرم اختصاصی می‌تواند به بررسی مراحل اولیه بیماری‌زایی قارچ در گیاه کمک کند. از سوی دیگر همسانه‌سازی و بیان این ژن می‌تواند در مطالعات آبی در بررسی برهمکنش این بیمارگر با ارقام و توده‌های بومی خربزه مورد استفاده قرار گیرد تا در صورت امکان بتوان ژن و یا ژن‌های مهارکننده این آنزیم را شناسایی کرد. لذا، مطالعه حاضر با هدف ردیابی و جداسازی ژن توماتیناز از فرم اختصاصی *melonis* بر اساس اطلاعات موجود از توالی این ژن در فرم اختصاصی *Lycopersici* انجام شد. با جداسازی ژن توماتیناز FOM و توالی‌یابی آن تفاوت‌ها و جهش‌های احتمالی آن با توماتیناز FOL بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه قارچ: جدایه مربوط به نژاد یک فرم اختصاصی *F. oxysporum f. sp. melonis* شایع در استان خراسان رضوی (اهدایی دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی، دانشگاه شیراز) تهیه شد.

کشت قارچ و استخراج DNA: به منظور تهیه میسلیوم، از محیط PDB (Potato Dextrose Broth) حاوی ۲۴ گرم در لیتر پودر Difco Potato Dextrose استفاده شد. بعد از ضدعفونی کردن محیط کشت آماده شده، هیف‌های قارچ در شرایط کاملاً استریل کشت و جهت استخراج DNA قارچ، به مدت ده روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با دور ۱۲۵ rpm و در حضور نور نگهداری شدند. بعد از گذشت ده روز از رشد قارچ، استخراج DNA به روش Gonzalez-Mendoza, et al (۷) با اندکی تغییرات انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

این مناطق یک جفت آغازگر اختصاصی بنام PSh30-F/R طراحی شد. این جفت آغازگر بر اساس اطلاعات موجود قطعه‌ای به طول ۱۰۹۱ جفت باز را از ژنوم FOL تکثیر می‌نماید. همچنین با توجه شباهت فرم‌های اختصاصی انتظار می‌رفت قطعه مشابهی نیز از ژنوم FOM تکثیر شود.

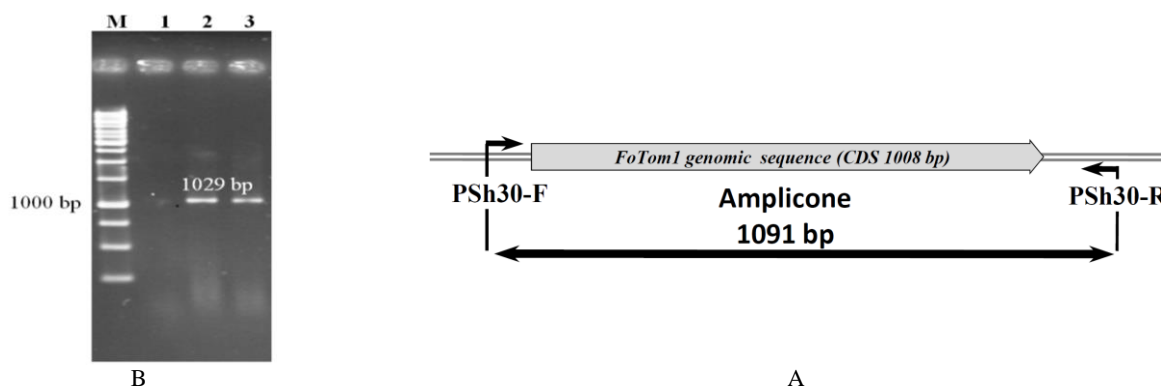
ردیابی همولوگ ژن FoTom1 در ژنوم FOM

بمنظور ردیابی ژن توماتیناز استخراج DNA از بافت میسلیموم جدایه (R1) مربوط به نژاد یک از فرم اختصاصی FOM انجام شد و همچنین بعنوان کنترل جدایه، از فرم اختصاصی FOL نیز استفاده شد. پس از بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای PSh30-F/R در الگوی الکتروفورزی مربوط به هر دو جدایه تک باند اختصاصی مشاهده شد (شکل ۱-ب). باند تکثیر شده با اندازه اندکی بالاتر از 1.1kb با قطعه قابل تکثیر مورد انتظار (۱۰۹۱ جفت باز) انطباق داشت. با توجه به انطباق تک باند تکثیر شده از ژنوم هر دو فرم اختصاصی با اندازه بدست آمده در آنالیزهای بیوانفورماتیک، نسبت به توالی‌یابی قطعه تکثیر شده اقدام شد تا صحت توالی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

ثانویه پروتئین بررسی گردید. توالی ژن توماتیناز جداسازی شده از Fom نامگذاری و با استفاده از برنامه sequin در بانک ژن NCBI ثبت گردید.

نتایج و بحث

ژن توماتیناز FoTom1 از جمله ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ترشحی است که در توسعه بیماری‌زایی قارچ FOL روی گیاه گوجه فرنگی نقش دارد. با توجه به گزارش‌های مربوط به ردیابی بخشی از توالی این ژن در فرم‌های اختصاصی دیگر در مطالعه حاضر تلاش شد بر اساس اطلاعات موجود نسبت به ردیابی توالی همولوگ ژن FoTom1 در ژنوم فرم اختصاصی FOM اقدام شود. در زمان نگارش پروژه، توالی کامل ژن توماتیناز مربوط به FOM در اختیار نبود بنابراین جهت طراحی آغازگر از توالی‌های این ژن در فرم‌های اختصاصی دیگر استفاده شد. به این صورت که با همدیفی ژن توماتیناز در سایر فرم‌های اختصاصی به وسیله نرم‌افزار Mega5، منطقه حفاظت شده ژن شناسایی و برای طراحی آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. توالی بالادستی و پائین دستی اختصاصی این ژن جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی مناسب بود (شکل ۱-الف). بر اساس



شکل ۱- نمای شماتیک (الف) و الگوی الکتروفورزی (ب) ژن توماتیناز نشان‌دهنده موقعیت توالی کدکننده (CDS)، محل اتصال آغازگرهای اختصاصی (PSh30-F/R) و طول قطعه قابل تکثیر بر اساس توالی FoTom1 (شماره دستیابی AJ012668)

Figure 1- Schematic view of tomatinase gene (A), and electrophoresis pattern of PCR products (B). Presents positions of coding sequences (CDS), special primers attachment sites (PSh30-F/R) and predicted amplicon size based on FoTom sequence with accession number (AJ012668)

دارند. در این محدوده ۱۰۲۵ نوکلئوتید کاملاً یکسان بود. مقایسه توالی ژن جدید FomTomR1 با توالی ژن FoTom1 نشان داد این دو ژن در ۱۴ نوکلئوتید با یکدیگر تفاوت دارند. ژن تکثیر شده فاقد هرگونه اضافه و کمداشت است. ژن FoTom1 فاقد اینترون می‌باشد لذا چهارچوب‌های خواندنی قابل کد شدن (ORF) در توالی تکثیر یافته نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد یک چهارچوب خواندنی در محدوده توالی‌یابی شده وجود

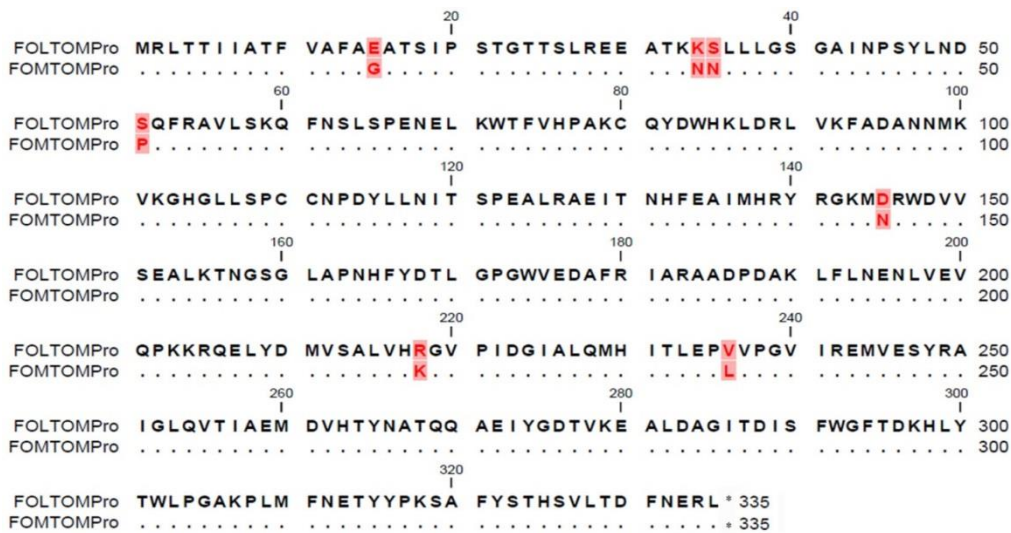
آنالیز توالی تکثیر شده از ژنوم Fom

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بعد از خالص‌سازی به صورت دوجهته توالی‌یابی شد. پس از انطباق نتایج توالی‌یابی دو جهته قطعه ای به طول ۹۶۳ نوکلئوتید بدست آمد که انتظار می‌رفت توالی کدکننده پروتئین توماتیناز را بطور کامل در برداشته باشد. همدیفی جفتی توالی قطعه تکثیر شده با توالی ژن FoTom1 نشان داد هر دو توالی در محدوده‌ای به طول ۱۰۳۹ نوکلئوتید با یکدیگر همپوشانی

گزارش شده از قارچ FOL نشان داد که از میان هفت جهش بروز یافته در سطح پروتئین‌ها یک جهش در موقعیت اسید آمینه ۱۵ در ناحیه سیگنال پپتید و سه جهش در اسیدآمینه‌های ۱۴۵، ۲۱۸ و ۲۳۶ در ناحیه دومین هیدرولازی قرار دارد (شکل ۳).

براساس آنالیزهای صورت گرفته انتظار می‌رود توالی شناسائی شده مربوط به همولوگ ژن FoTom1 باشد. از آنجا که این ژن در ژنوم فرم اختصاصی Fom شناسائی شده است لذا بصورت FomTomR1 نامگذاری شد. سه حرف ابتدائی نشان‌دهنده نام فرم اختصاصی قارچ (Fom)، سه حرف دوم مربوط به نام ژن توماتیناز (Tom) و شماره ۱ مربوط به شماره همولوگ آن در فرم اختصاصی Fol است. توالی نوکلئوتیدی این ژن با شماره دستیابی (MF178403) در بانک ژن ذخیره شد.

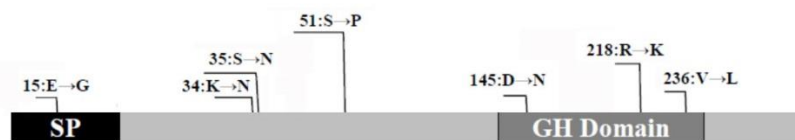
دارد که با توالی ژن FoTom1 انطباق دارد. چهارچوب خواندنی صحیح با ۳۳۵ کدون می‌تواند پروتئین ۳۳۵ اسیدآمینه‌ای را کد نماید. هم‌ردیفی این پروتئین فرضی با پروتئین FoTom1 نشان داد ۹۸ درصد از اسیدهای آمینه هر دو پروتئین با یکدیگر یکسان هستند، ولی دو پروتئین در ۷ اسید آمینه با یکدیگر متفاوت هستند (شکل ۲). با این حال آنالیز توالی این پروتئین در برنامه SMART نشان داد از نظر نوع، موقعیت و تعداد دومین‌ها پروتئین جدید با پروتئین FoTom1 مشابه است. توالی سیگنال پپتید در ابتدای این پروتئین در محدوده ۱ تا ۲۳ قرار گرفته است. حضور این توالی نشان‌دهنده ترش‌حی بودن این پروتئین است. در توالی این پروتئین دُمین هیدرولازی در محدوده ۷۰ تا ۳۲۳ قرار گرفته است. بررسی موقعیت جهش‌ها در توالی تکثیر شده در مقایسه با توالی پروتئین توماتیناز



شکل ۲- نتایج هم‌ردیفی ترجمه توالی نوکلئوتیدی (FOMTOMPro) تکثیر شده از قارچ FOM با توالی پروتئین توماتیناز (FOLTOMPro) مربوط به FOL با استفاده از برنامه MEGA

اسیدآمینه‌های مشابه بصورت نقاط و جهش‌های بروز یافته در سطح اسید آمینه‌ها با پس زمینه نشان داده شده است.

Figure 2- Alignment of translation of amplified sequence (FOMTOMPro) from FOM with the protein sequence of proteinase (FOLTOMPro) from FOL using MEGA5 software. Identical residues are dotted and non-synonym mutations are shaded with red background.



شکل ۳- نمای شماتیک موقعیت جهش‌های شناسایی شده در توالی پروتئینی FomTomR1 در مقایسه با پروتئین توماتیناز مربوط به قارچ FOL (CAA10112). SP: سیگنال پپتید، GH dom: دُمین گلیکوزید هیدرولاز

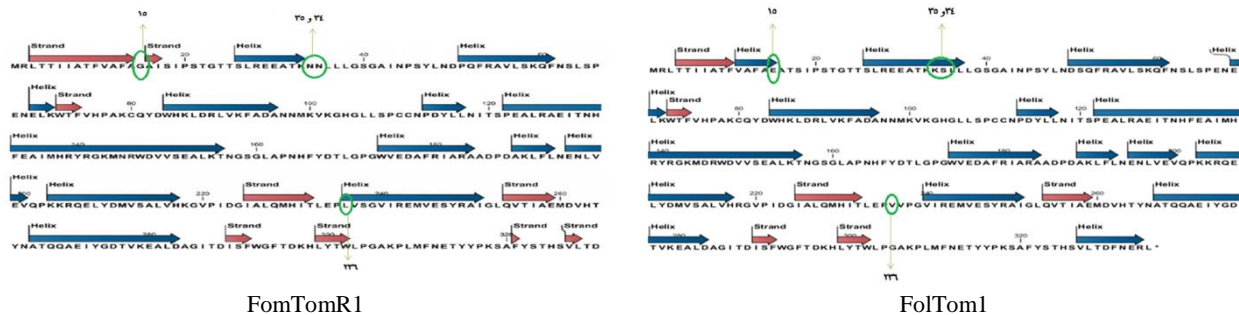
Figure 3- Schematic view of the mutation positions in predicted tomatinase homologues in FOM race 1 in comparison with sequence of the FOL tomatinase FolTom1 (CAA10112). SP: signal peptide, GH Dom: Glycoside hydrolase

سه جهش در دمین کارکردی پروتئین رخ داده است که در جایگاه ۱۴۵ یک اسید آمینه اسیدی با بار منفی جای خود را به اسید آمینه قطبی و بدون بار داده است. جایگزینی صورت گرفته در جایگاه های ۲۱۸ و ۲۳۶ از نظر قطبیت و بار یکسان بوده است. در جایگاه ۲۱۸ هر دو اسید آمینه قطبی دارای بار مثبت می‌باشند. در جایگاه ۲۳۶ نیز هر دو اسید آمینه غیر قطبی هستند.

پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین TomFOL و TomFOM با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 نشان داد که چهار جهش اسید آمینه‌ای، منجر به تغییر ساختار ثانویه پروتئین شده است. مقایسه شکل‌های ۴ تفاوت ساختار ثانویه را نشان می‌دهد. همچنین جهش ناحیه ۲۳۶ که ایجاد ساختار آلفا هلیکس در TomFOM کرده است در ناحیه دمین گلیکوزیل هیدرولازی قرار دارد. بر اساس مقایسه ساختارها در دو پروتئین انتظار می‌رود در نتیجه جهش‌های رخ داده در فرم اختصاصی FOM ساختار ثانویه در موقعیت‌های ۱۵، ۳۴، ۳۵ و ۲۳۶ ساختار آلفا هلیکس را تغییر داده است.

پیش‌بینی اثرات جهش‌ها در توالی همولوگ ژن توماتیناز در قارچ FOM

در تعدادی از اسید آمینه‌های جایگزین شده قطبیت و بار الکتریکی متفاوت بود. در اسید آمینه جایگاه پانزده اسید آمینه گلايسين که غیر قطبی است بجای گلوتامیک اسید (بار منفی و خاصیت اسیدی) قرار گرفته است. این منطقه مربوط به توالی سیگنال پپتید است و لذا انتظار می‌رود در عملکرد پروتئین پس از ترشح از قارچ تأثیری نداشته باشد. سه جهش در حد فاصل سیگنال پپتید و دومین هیدرولازی قرار گرفته‌اند که انتظار می‌رود بیشتر نقش ساختاری داشته باشند. در جهش اول لیزین به عنوان یک اسید آمینه قطبی با بار مثبت جای خود را به اسپارژین داده است که یک اسید آمینه قطبی ولی بدون بار به شمار می‌رود. در جایگاه‌های ۳۵ و ۵۱ اسید آمینه سرین به ترتیب جای خود را به اسپارژین و پرولین داده است. هر چند هر سه اسید آمینه قطبی و بدون بار هستند، ولی با توجه به ساختار متفاوت پرولین انتظار می‌رود جهش جایگاه ۵۱ در ساختمان پروتئین تأثیر گذار باشد.



شکل ۴- مقایسه ساختارهای آلفا هلیکس و بتا شیت در پروتئین توماتیناز در فرم اختصاصی FOL و FOM

فلش‌های آبی رنگ ساختار آلفا هلیکس و فلش‌های قرمز رنگ ساختار B، دواير سبز رنگ موقعیت اسیدهای آمینه جهش یافته را نشان می‌دهد (رسم شده به وسیله نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5).

Figure 4- Comparison of alpha helix and beta sheet structures in homologs of tomatinase protein in forma specials FOL (FolTom1) and FOM (FomTomR1)

Blue and red arrows: alpha helix and beta sheet structure respectively, green circles: position of mutated residues.

است بنابراین از اطلاعات این ژن استفاده شده و آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر این ژن در ژنوم این قارچ طراحی، قطعه مورد نظر تکثیر و توالی‌یابی گردید. ناحیه کدکننده توماتیناز مربوط به قارچ FOM، دارای چارچوب خواند باز با طول ۹۹۵ جفت باز می‌باشد که فاقد اینترون است. ژن توماتیناز یک پروتئین پیش‌بینی شده با تعداد ۳۳۵ اسید آمینه را کد می‌کند که وزن مولکولی آن حدود ۳۸ کیلو دالتون می‌باشد. توالی پروتئینی پیش‌بینی شده، در مقایسه با FoTom1 شامل دو جایگاه فعال آنزیمی در موقعیت ۱۲۳ و ۱۵۲ دارای اسید آمینه گلوتامیک اسید و یک پپتید سیگنالی ۱۶ اسید آمینه‌ای در انتهای N می‌باشد. ژن توماتیناز FOM مشابه ژن FoTom1 یک

نتیجه گیری

امروزه آنزیم‌های گلیکوزیل هیدرولاز به علت استفاده وسیع در کاربردهای بیوتکنولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. توماتیناز یک آنزیم گلیکوزیل هیدرولازی است که تأثیر آن در مکانیسم بیماری‌زایی بعضی از قارچ‌ها ثابت شده است. با توجه به گزارش حضور ژن توماتیناز در قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* با استفاده از تکنیک هیبریداسیون (۸)، اثبات حضور این ژن در ژنوم قارچ FOM با استفاده از روش‌های مولکولی دیگر و شناسایی توالی کامل این ژن ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر همولوگ ژن توماتیناز در قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi* به طور دقیق‌تری بررسی شده

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم را جهت اجرای این تحقیق مهیا نمودند صمیمانه تشکر می‌نمائیم.

دُمین گلیکوزیل هیدرولازی مربوط به خانواده ۱۰ در محدوده ۳۲۳-۷۰ دارد. بررسی *FomTomR1* و مقایسه آن با *FoTom1* وجود ۱۴ موتاسیون در سطح نوکلئوتیدی را تأیید نمود که نیمی از این جهش‌ها معنی‌دار بوده و در سطح پروتئین نیز ایجاد موتاسیون کرده‌اند. چند جهش پروتئینی به تغییر خاصیت شیمیایی اسیدهای آمینه و تغییر ساختار ثانویه نیز منتج شد که یکی از این تغییرات ساختار ثانویه در محدوده دُمین گلیکوزیل هیدرولازی می‌باشد.

منابع

- 1- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology, 5th ed. Academic Press. 922 pp.
- 2- Arneson P., and Durbin RD. 1968. Studies on the Mode of Action of Tomatine as a Fungitoxic Agent. Plant Physiology 43: 683-686.
- 3- Carter J.P., Spink J.P., Cannon M., Daniels J., and Osbourn A.E. 1999. Isolation, characterization and avenacin sensitivity of a diverse collection of cereal-root-colonizing fungi. Appl. Environ. Microbiology 65: 3364-3372.
- 4- Crombie W.M.L., Crombie L., Green J.B., and Lucas J.A. 1986. Pathogenicity of the take-all fungus to oats: its relationship to the concentration and detoxification of the four avenacins. Phytochemistry 25: 2075-2083.
- 5- Davies G., and Hernissat B. 1999. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Curr Biology 3: 853-859.
- 6- Ford J.E., McCance D.J., and Drysdale R.B. 1977. The detoxification of a-tomatine by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytochemistry 16: 545-546.
- 7- González-Mendoza D., Argumedo-Delira R., Morales-Trejo A., Pulido-Herrera A., Cervantes-Díaz L., Grimaldo-Juarez O., and Alarcón A. 2010. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. Genetics and Molecular Research 9(1): 162-166.
- 8- Ito S., Kawaguchi T., and Nagata A. 2004. Distribution of the FoTom1 gene encoding tomatinase in formae speciales of *Fusarium oxysporum* and identification of a novel tomatinase from *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the causal agent of Fusarium crown and root rot of tomato. Journal Gen Plant Pathology 70: 195-201.
- 9- Ito S., Nagata A., Kai T., Takahara H., and Tanaka S. 2005. Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants. Physiol. Mol. Plant Pathology 66: 183-191.
- 10- Keukens E.A.J., Vrije T., Van den Boom C., Waard H., Plasmna H., Thiel F., Chupin V., Jongen W.M.F., and Kruijff B.de. 1995. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. Biochim. Biophys. Acta, 1240: 216-228.
- 11- Lairini K., Pérez-Espinosa A., Pineda M., and Ruiz-Rubio M. 1996. Purification and characterization of tomatinase from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Appl. Environ. Microbiology 62: 1604-1609.
- 12- Lairini K., Perez-Espinosa A., and Ruiz-Rubio M. 1997. Tomatinase induction in formae specials of *Fusarium oxysporum* non-pathogenic of tomato plants. Physio Mol Plant Pathology 50: 37-52.
- 13- Lairini K., and Ruiz-Rubio M. 1998. Detoxification of a-tomatine by *Fusarium solani*. Mycol. Research 11: 1375-1380.
- 14- Morrissey J.P., and Osbourn A.E. 1999. Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. Microbiol mol biol R, 63: 708-724.
- 15- Osbourn A.E. 1996. Saponins and plant defence—a soap story. Trends Plant Science 1:4-9.
- 16- Pegg G.F., and Woodward S. 1986. Synthesis and metabolism of- tomatine in tomato isolines in relation to resistance to *Verticillium albo-atrum*. Physiol. Mol. Plant Pathology 28: 333-338.
- 17- Roldán-Arjona T., Perez-Espinosa A., and Ruiz-Rubio M. 1999. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a New Class of Saponinases. MPMI 12: 852-861.
- 18- Safe L.M., Safe S.H., Subden R.E., and Morris D.C. 1977. Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei* and *Candida tropicalis*. Can. J. Microbiology 23: 398-401.
- 19- Sandrock R.W., DellaPenna D., and VanEtten H.D. 1995. Purification and characterization of b2-tomatine, an enzyme involved in the degradation of a-tomatine and isolation of the gene encoding b 2-tomatine from *Septoria lycopersici*. Mol. Plant-Microbe Interact 8: 960-970.
- 20- Steel C.C., and Drysdale R.B. 1988. Electrolyte leakage from plant and fungal tissues and disruption of liposome membranes by- tomatine. Phytochemistry 27:1025-1030.
- 21- VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., and Farmer EE. 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins”. The Plant Cell 6: 1191-1192.

Homology Base Tracking of *Tomatinase* in the Genome of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

F. Zarandi^{1*} - F. Shokouhifar² - B. Sharif Nabi³ - B.E. Sayed Tabatabaei⁴ - Z. Bani Hashemi⁵

Received: 04-11-2016

Accepted: 13-12-2017

Introduction: Phytopathogenic fungi exposes various proteins to overcome plant defense systems. Production of saponins likes α -Tomatine is one of the tomato preformed defenses barriers which should be detoxicated by the pathogens. It has been revealed before which most of *Fusarium* species and forma specials could produce tomatinase, a glycosyl hydrolases protein, to de-glycosylate α -Tomatine. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) wildy attached melon cultivars and at the time of this investigation, there was only one report underlining the existence of the gene sequence of tomatinase in the genome of FOM using southern blotting experiment. This study was carried out to track the whole tomatinase gene sequence in the FOM genomic sequence and investigate the probability genetic variation of the gene in the nucleotide and protein sequences.

Materials and Methods: *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) race1 have been previously reported in Khorasan, Iran. It was cultured in liquid medium and the mycelia were used for the genomic DNA isolation. Primers were designed based on conserved sequence in upstream and downstream of FoTom1 sequence (AJ012668). PCR was carried out and amplified segments were bi-directional sequenced. The results were then analyzed by Vector NTi software. The sequencing result was aligned with FoTom1 sequence as Refseq and the single nucleotide variations were detected by CLC work bench software. The effects of the mutations on the protein structure were predicted by CLC work bench software.

Results and Discussion: Electrophoresis pattern of PCR products showed a single band of the expected size in the strain FomR1 that was at the same size of the band amplified from FoL genome. The designed primers based on the FoTom1 sequence amplified a specific segment in the Fom genome. Alignment the sequencing results with the Fo-Tom1 from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (Fol) in nucleotide level revealed 14 mutations which seven of them were appeared in the protein sequence. Three mutations occurred in the functional domain of the protein. At the position 145, an acidic amino acid with a negative charge was substituted by a polar amino acid. Replacements at positions 218 and 236 were the same in terms of polarity and at position 218; both amino acids have a positive charge.

There were no introns in the coding sequence of FomTom R1 region as same as FoTom1. Pairwise alignment results showed some an-synonyms mutations between two sequences that made some changes in the secondary structure of the translated protein from FomTomR1. The first an-synonym mutation, SNP15 (E→G), inside the signal peptide, converts the alpha helix to a new beta sheet. SNP34 (K→N) and SNP35 (S→N) mutations shortened the alpha helix. The other mutations happened out of the alpha helixes and beta sheets. To predict the effects of the mutations on the FomTomR1function, in-silico analyses were carried out. The results revealed that three mutations occurred in the functional domains of tomatinase in Fom. The mutations in the hydrolysis domain may affect the structure of FomTomR1and can be effective in the protein. The presence of different active saponins components in Melon may be an evolutionary reason for some variation in sequence and structure of the FomTomR1 protein in Fom. To prove the differences in the tomatinase function, the interaction of proteins with various types of melon saponins components should be investigated at the future studies.

Conclusion: The results showed the tracked sequence could be homolog of the Tomatinse gene in the Fom genome. We named it Fom-TomR1 and the sequenced was submitted in the Genbank with accession number MF178403. For the future study, the gene influences should be investigated in the pathogenesis of FOM on melon cultivars and it could be considered as a general screening index using heterologous expression of the

1 and 4- M.Sc. Student and Professor, Department of Biotechnology, Esfahan University of Technology, Esfahan (*- Corresponding Author Email: fateme.zarandi77@yahoo.com)

2- Assistant Professor Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Professor Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Esfahan University of Technology, Esfahan

5- Professor Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz

gene.

Keywords: Fusarium wilts disease, Gene detection, Secondary structure prediction, Single nucleotide polymorphism